

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
: Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Mai 2005 (06.05.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/039633 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 39/008**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/002383

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Oktober 2004 (22.10.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
03090368.6 24. Oktober 2003 (24.10.2003) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **MOLOGEN AG** [DE/DE]; Fabeckstrasse 30, 14195
Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WITTIG, Burghardt**
[DE/DE]; Salzachstrasse 33, 14129 Berlin (DE).
FUERTES-LÓPEZ, Laura [ES/ES]; C/Alonso Cano
72, 3º dcha, E-28003 Madrid (ES). **TIMÓN-JIMÉNEZ,**
Marcos [ES/ES]; C/ Santa Clara 34, 2K, E-28200 San
Lorenzo de El Escorial (ES).

(74) Anwalt: **BOECKH, Tobias**; Hertin Anwaltssozietät, Kur-
fürstendamm 54/55, 10707 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: AGENT FOR TREATING LEISHMANIA INFECTIONS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON INFEKTIONEN MIT LEISHMANIEN

(57) Abstract: The invention relates to using a combination of DNA-expression constructs for producing a drug for immunisation against leishmania infections and a corresponding vaccine. The DNA-expression construct is also disclosed. According to said invention the immunogene P36 LACK is used in combination with a leishmania infantum thiol-specific antioxidant protein gene (TSA), leishmania infantum kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11) and with a leishmania infantum GP63 antigen for producing an immune response. Plasmides, preferably minimalist immunologically defined gene-expression constructs (MIDGE) can be used in the form of the DNA-expression construct. The inventive DNA-expression construct makes it possible to produce a vaccine for treating leishmania infectious diseases and is used in the form of a component of said vaccine.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Kombination von DNA-Expressionskonstrukten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmanien-Infektionen, sowie eine entsprechende Vakzine. Die DNA-Expressionskonstrukte selbst sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass das immunogene p36 LACK in Kombination mit dem Leishmania infantum *thiol-specific antioxidant protein* Gen (TSA), dem Leishmania infantum *kinetoplastid membrane protein 11* Gen (Kmp-11) und dem Leishmania infantum *gp63* Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort verwendet wird. Als DNA-Expressionskonstrukte können Plasmide eingesetzt werden, bevorzugt werden erfindungsgemäß minimalistische, immunologisch definierte Genexpressionskonstrukte (MIDGE) verwendet. Die erfindungsgemäßen DNA-Expressionskonstrukte dienen zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von Leishmanien-Infektionskrankheiten und sind Bestandteil einer entsprechenden Vakzine.

WO 2005/039633 A1

MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON INFESTIONEN MIT LEISHMANIEN

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Kombination von DNA-Expressionskonstrukten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, sowie eine entsprechende Vakzine. Die DNA-Expressionskonstrukte selbst sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten aus der Ordnung Kinetoplastida, die durch weibliche blutsaugende Sandmücken der Gattung Phlebotomus und Lutzomyia auf verschiedene Säugetierspezies und auf den Menschen übertragen werden. Leishmaniosen sind Erkrankungen mit verschiedenen klinischen Krankheitsbildern, die ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellen. Die WHO schätzt, dass weltweit ca. 12 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen sind. Ca. 2 bis 9% aller HIV-Patienten erkranken an visceraler Leishmaniose, damit ist dies die dritt häufigste parasitäre Krankheit, an der HIV-positive Personen erkranken. Während bei den mukokutanen und kutanen Leishmaniosen erhebliche Gewebedestruktionen auftreten, endet eine unbehandelte viszerale Leishmaniose (Kala-Azar) meist tödlich.

Für die Behandlung der Erkrankung stehen nur wenige klinisch erprobte Medikamente zur Verfügung. So werden seit etwa 60 Jahren zur Therapie der viszeralen Leishmaniose Chemotherapeutika – meist Verbindungen des Schwermetalls Antimon – eingesetzt. Die zum Teil massive Toxizität der meisten dieser Präparate begrenzt jedoch deren Einsatz. Zudem haben die Leishmanien in vielen Gebieten Resistenzen gegen Antimonpräparate entwickelt (J Postgrad Med. 2003 Jan-Mar; 49(1):61-8).

Eine verträgliche und protektive Routineimpfung gibt es bislang nicht.

Da Personen, die die Infektion überstanden haben, eine starke Immunität gegen eine spätere Infektion entwickeln, sollte die Entwicklung eines wirksamen Impfschutzes möglich sein.

Die Impfung bzw. Immuntherapie von Leishmaniose, deren Ursache intrazelluläre Parasiten sind, sollte durch die Erzeugung einer Th1-typischen Immunreaktion mög-

lich sein. Im Stand der Technik wird vielfach auf die Bedeutung der Erzeugung einer Th1-Antwort in der Therapie oder Prävention von Leishmaniose hingewiesen. (Handman et al., J Immunol 160: 3949-57, Gurunathan et al., Nature Med: 4(12): 1409-15). Zur Förderung der Auslösung einer Th1-typischen Immunantwort wird auf
5 das kostimulatorische Zytokin IL-12 als unerlässliches Adjuvanz verwiesen (Parker et al., J. Immunol. 140: 896-902).

Zusätzlich können immunstimulatorische Nukleinsäuresequenzen (ISS) als Adjuvanz eingesetzt werden. Die CpG-Motive der ISS bewirken eine Erhöhung der Aktivität von NK-Zellen und Makrophagen sowie eine starke Stimulation der zellulären
10 TH1-Immunantwort. Bevorzugt können kovalent geschlossene ISS mit einer Länge von 30 bp eingesetzt werden, wie sie beispielsweise in der EP 1 196 178 A1 beschrieben sind.

Verschiedene Antigene wurden in experimentellen Impfprotokollen in Mäusen getestet. Die immunologische Reaktion in Mäusen auf diese Infektion, scheint der im
15 Menschen und wahrscheinlich auch der in Hunden zu gleichen (Cox, Int. J. Parasitol. 263: 1147-1157). Verwendete Antigene waren das gp 63 (Scott et al., J. Exp Med. 168: 1675-1684), gp 46 (McMahon-Pratt et al., Infection and Immunity 61: 3351-3359), p-4 und p-8 (Scott et al., Immunology 99: 615-624) sowie das p36 oder auch als LACK bezeichnete Antigen (Gonzales-Aseguinolaza et al., Eur. J. Biochem. 259: 909-916). Das erfolgreichste Impfreime, Erstimmunisation mit p36 Protein, Zweitimmunisation mit Vaccinia Virus, kodierend für p36 und IL-12, führte zu
20 einer durchschnittlichen Verkleinerung der Läsionen um 52% im Vergleich zu ungeimpften Mäusen (Gonzalo et al., Microbes and Infection: 3 (9): 701-711).

Neben einem nur 52%igem Schutz wurden in dem zitierten Versuch Vaccinia-Viren
25 als Genfährten eingesetzt. Dabei handelt es sich um virale Vektoren, die auf Grund ihrer hohen Transfektionseffizienz immer noch die am häufigsten eingesetzten Genfährten darstellen. Es ist jedoch bekannt, dass ein hohes Risiko einer zytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die transfizierten Zellen besteht. So führte die Anwendung einer hohen Dosis eines Adenovirus bei einem klinischen Versuch
30 zum Tod des Patienten; offensichtlich war die Ursache dafür eine starke Überreaktion des Immunsystems (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518). Weiterhin ist durch

die Instabilität des attenuierten Impfstammes die Rückverwandlung in einen virulenten Stamm nicht auszuschließen. Außerdem können die viralen Bestandteile selbst immunogen wirken, was zu einer Herabsetzung ihrer Wirksamkeit durch das Immunsystems des Patienten führt.

5 In eigenen Arbeiten der Anmelderin wurden BALB/c Mäuse mit minimalistischen Expressionsvektoren kodierend für das p36 LACK-Antigen immunisiert. Dabei wurden verschiedene Impfschemata angewendet. Im Rahmen dieser Studie konnte in einer Gruppe ein 57%iger Schutz vor einer Infektion mit *Leishmania major* erreicht werden (L. Lopez-Fuertes et al., 2002, Vaccine 21: 247-257).

10 Gurunathan et al. setzten das p36 LACK-Antigen, durch eukaryotische Expressionsvektoren kodiert, in Impfversuchen in Mäusen ein (J. Exp. Med., Vol 186, No. 7, (1997): 1137-1147).

In anderen Ansätzen wurden verschiedene Antigenkombinationen eingesetzt. Mit einem Gemisch an Plasmid-DNA, kodierend für TSA und LmST11, konnte so die
15 Größe der Läsionen über einen bestimmten Zeitraum nach der Infektion kleingehalten werden (A. Campos-Neto et al., 2002, Infection and Immunity: 2828-2836).

Die Dreierkombination der Antigene LACK, LmST11 und TSA konnte das Auftreten von dermalen Läsionen nach der Infektion zum großen Teil verhindern und führte zu einem über mehrere Wochen anhaltenden Schutz (S. Mendez et al., 2001, J. of Immunology 166: 5122-5128).
20

Allen zitierten Versuchen ist gemeinsam, dass durch sie nur ein teilweiser und damit unzureichender Schutz vor einer Infektion mit Leishmaniose erreichbar war. Ebenso wurden die Impfstoffkombinationen nachteilhafterweise nicht in Hunden, dem Hauptüberträger, sondern in Mäusen erprobt. Ein weiterer Nachteil ist, dass die ein-
25 gesetzten Genfähren Plasmide sind. Plasmide werden durch bakterielle Fermentation gewonnen. Dadurch enthalten sie neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige DNA, üblicherweise Resistenzgene gegen bei der Fermentation verwendete Antibiotika. Bei der Verwendung von Genexpressionskonstrukten auf Basis von Plasmid-DNA besteht dadurch das inhären-

te Risiko der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei Schutzimpfungskampagnen nicht vertretbar ist. In der medizinischen Praxis stehen die beschriebenen Nachteile plasmidbasierter Expressionsvektoren ihrer breiten Anwendung massiv entgegen.

- 5 Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein DNA-Expressionskonstrukt bzw. auch mehrere DNA-Expressionskonstrukte zur Verfügung zu stellen, welche zur Herstellung eines Arzneimittels zur effizienten Immunisierung gegen Leishmaniose verwendet werden können.
- 10 Die Aufgabe wird durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst.

Als DNA-Expressionskonstrukte werden bevorzugt werden erfindungsgemäß minimalistische, immunologisch definierte Genexpressionskonstrukte verwendet, die im Folgenden als MIDGE-Vektoren bezeichnet werden (MIDGE®: MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS, vgl. EP 0 941 15 318 B1, US 6,451,593 B1). Die MIDGE-Vektoren haben den Vorteil, dass durch sie auf Strukturen verzichtet werden kann, die für die therapeutische Wirkung nicht essentiell sind.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass das immunogene Antigen p36 LACK in Kombination mit dem *Leishmania infantum thiol-specific antioxidant protein* Antigen (TSA), dem *Leishmania infantum kinetoplastid membrane protein 11* Anti- 20 gen (Kmp-11) und dem *Leishmania infantum Glykoprotein 63* (gp63) Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort verwendet wird.

Infolgedessen ist die Verwendung eines DNA-Expressionskonstruktes zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen vorgesehen, wobei besagtes DNA-Expressionskonstrukt ein oder mehrere kodierende 25 Nukleinsäuresequenzen enthält, welche zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.

Bevorzugt ist aber auch die Verwendung von zwei oder drei DNA-Expressionskonstrukten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, wobei besagte DNA-Expressionskonstrukte jeweils ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, die gemeinsam zur

5 Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein* Gen (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass wenigstens zwei der *Leishmania infantum* Antigene als Fusionsprotein exprimiert werden. Dabei kann es sich einerseits um

10 das Fusionsprotein - als Expressionsprodukt - aus *thiol-specific antioxidant protein* Gen (TSA) und *kinetoplastid membrane protein 11* Gen (Kmp-11), oder einer Kombination derselben, handeln. Dementsprechend ist auch im Hinblick auf die drei unterschiedlichen *Leishmania infantum* Antigene ein Fusionsprotein – als Expressionsprodukt - aus *thiol-specific antioxidant protein* Gen (TSA), Glykoprotein gp63

15 Gen und *kinetoplastid membrane protein 11* Gen (Kmp-11), oder einer Kombination derselben, bevorzugt.

Unter „einer Kombination derselben“ wird hierbei verstanden, dass jedwede Reihenfolge/Ausrichtung der Gene bzw. der Leserichtung verstanden wird, also z.B. [TSA - Kmp-11], aber auch [Kmp-11 – TSA], bzw. [TSA – gp63 – Kmp-11] oder (TSA –

20 Kmp-11 – gp63] oder [Kmp-11 – TSA – gp63] usw. usw..

Es ist demnach also ebenfalls ein Genexpressionskonstrukt kodierend für gegebenenfalls unterschiedliche Fusionsproteine vorgesehen. Das Fusionsprotein besteht wie beschrieben aus einer Kombination von mindestens zwei der benannten Antigene (TSA, Kmp-11). Das Bifusionsprotein wird alleine oder in Kombination mit dem

25 Antigen gp 63 eingesetzt.

Das Fusionsprotein kann jedoch auch wie beschrieben aus drei Antigenen bestehen. Es handelt sich dann um eine Kombination der Antigene TSA, Kmp-11 und gp63.

Ferner ist eine Verwendung bevorzugt, wobei zusätzlich zu den beschriebenen DNA-Expressionsprodukten – gleichgültig ob dabei Fusionsproteine exprimiert werden oder nicht – ein DNA-Expressionskonstrukt zur Expression des Leishmania Antigen p36 LACK oder eines Allels oder Derivates davon mit entsprechender Funktion enthalten ist. Das p36 LACK Antigen kann demnach diesem Cocktail optional
5 zugesetzt werden.

Unter einem „Allel oder Derivat davon mit entsprechender Funktion“ wird im Sinne der Erfindung verstanden, dass es sich auch um homologe Sequenzen handeln kann, wobei der Homologiegrad insoweit unbeachtlich ist, als das dieselbe Funktion
10 den betreffenden Gens gewährleistet und erhalten bleibt.

Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene MIDGE-Expressionskassette verwendet. Die immunisierenden Polynukleotidsequenzen liegen als Expressionskonstrukte vor, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schleifen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promotors und einer Terminatorsequenz bestehen. Die Expressionskassette besteht also aus der kodierenden Sequenz, dem Promotor und gegebenenfalls einer Terminationssequenz, so dass das
20 Konstrukt nur die für die Expression des gewünschten Gens notwendige Information enthält, was letztlich die Nachteile der Genfähren viralen Ursprungs vermeidet. Ferner ist erfindungsgemäß vorgesehen, dass das (oder die) DNA-Expressionskonstrukt(e) zur Steigerung der Transfektionseffizienz jeweils mit einem
25 Oligopeptid aus 3 bis 30 Aminosäuren konjugiert ist, wobei das Oligopeptid zur Hälfte aus basischen Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin besteht. Besonders bevorzugt ist eine Kernlokalisationssequenz, insbesondere

- die ein Kern-Lokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) darstellende Peptidsequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) aus dem Simian Virus SV-40. Speziell für das SV-40-NLS wurde gezeigt, dass Proteine bis zu 465 kDa zum Zellkern gesteuert werden (Lanford
30

- 7 -

et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). Diese Fähigkeit des Peptids wurde hier durch Kopplung an DNA für die Verbesserung des Gentransfers genutzt.

- oder das elf Aminosäuren lange T-Peptidfragment YGRKKRRQRRR des HIV-1 Genprodukts TAT.

- 5 Es sind demnach Proteine, die die Transfektionseffizienz von DNA Impfstoffen verstärken, beispielsweise kationische Peptide und Proteine, als Bestandteil der Expressionskonstrukte bevorzugt.

Die kodierenden Polynukleotidsequenzen können auch in einem zirkulär doppelsträngigen Expressionsvektor vorliegen.

- 10 Es ist bekannt, daß durch Optimierung der Kodonbenutzung (Codon Usage Optimization) innerhalb des Expressionskonstruktes an die präferentiell in Säugern benutzten Kodons die Expression von Proteinen erheblich gesteigert werden kann (Grantham et al., Nucleic Acids Res 1980, 9:1893-912). Um mehr Antigen in-vivo zu exprimieren und damit eine stärkere Immunantwort auszulösen, die sich in einem
- 15 wirksamen und dauerhaften Schutz vor der Infektion mit Leishmaniose zeigt, wurde die Wildtyp Sequenz von gp63 optimiert. Unter Optimierung soll die Kodon-Anpassung, auch als "Codon-Usage-Optimization" bezeichnet, verstanden werden. Dazu wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt, die die Synthese dieser optimierten DNA-Sequenz des gp63 aus Oligonukleotiden ermöglichte.

- 20 Erfindungsgemäß wurde die Sequenz des Leishmania infantum gp63 Antigens daher kodonoptimiert (Seq.ID 5). Ein DNA-Expressionskonstrukt, welches diese Sequenz aufweist, ist mithin ebenfalls bevorzugt.

- Die erfindungsgemäßen DNA-Expressionskonstrukte dienen zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten und sind Be-
- 25 standteil einer entsprechenden Vakzine.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung kann die Vakzine immunstimulatorische Nukleinsäuresequenzen (ISS) umfassen. Die immunstimula-

torischen Nukleinsäuresequenzen, CpG Motive enthaltend, umfassen einen zirkulären Strang Desoxyribonukleinsäure mit einer teilweise zueinander komplementären, antiparallelen Basensequenz. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die immunstimulatorischen Nukleinsäuresequenzen hantelförmig.

- 5 Ebenso ist die Kombination des erfindungsgemäßen Impfstoffes mit transfektionsverbessernden Verbindungen, wie beispielsweise PEI (Polyethylenimin), denkbar.

Zur Transfektion können biologische, chemische und/oder physikalische Methoden eingesetzt werden, die zum Stand der Technik gehören, beispielsweise Transfektion mittels ballistischem Transfer oder Elektroporation. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Transfektion mittels intradermaler Injektion durch
10 Spritzen oder nadelfreier Injektionsgeräte.

Das beigefügte Sequenzprotokoll, welches Bestandteil der Anmeldung und vorliegender Beschreibung ist, gibt folgende Sequenzen wieder.

	<u>Seq.ID</u>	<u>Sequenzname/-beschreibung</u>
15	Seq.ID 1	DNA-Sequenz des <i>Leishmania infantum</i> <i>kinetoplastid membrane protein 11</i> Ggens (Kmp-11)
	Seq.ID 2	Protein-Sequenz des <i>Leishmania infantum</i> <i>kinetoplastid membrane protein 11</i> Antigens (Kmp-11)
20	Seq.ID 3	DNA-Sequenz des <i>Leishmania infantum</i> <i>thiol-specific antioxidant protein</i> Gens (TSA)
	Seq.ID 4	Protein-Sequenz des <i>Leishmania infantum</i> <i>thiol-specific antioxidant protein</i> Antigens (TSA)
	Seq.ID 5	DNA-Sequenz des kodon-optimierten <i>Leishmania infantum</i> Antigens <i>Glykoprotein 63</i> (gp63)
25	Seq.ID 6	Protein-Sequenz des kodon-optimierten <i>Leishmania infantum</i> Antigens <i>Glykoprotein 63</i> (gp63)

- 9 -

Seq.ID 7	DNA-Sequenz Leishmania infantum Antigen p36 (LACK)
Seq.ID 8	Protein-Sequenz Leishmania infantum Antigen p36 (LACK)
Seq.ID 9	Kernlokalisationssequenz (Peptidsequenz) des SV40
Seq.ID 10	Langes T-Peptidfragment des HIV-1 Genprodukts TAT (TAT-Peptid)

5

Seq.ID 11 bis Seq.ID 36 synthetische DNA-Oligomere wie unten beschrieben.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Figuren und Ausführungsbeispielen näher beschrieben und diskutiert.

- 10 Die überraschende Wirkung der erfindungsgemäßen Kombination von DNA-Expressionskonstrukten und eines Arzneimittels, welches eine solche Kombination enthält, wird anhand der Darstellungen gem. der Figuren deutlich. Dabei bedeuten:

MIDGE-NLS p36	mit NLS gekoppelter MIDGE kodierend für das p36 LACK Antigen
15 MIDGE-NLS TSA	mit NLS gekoppelter MIDGE kodierend für das TSA Antigen
MIDGE-NLS gp63	mit NLS gekoppelter MIDGE kodierend für das gp63 Antigen
MIDGE-NLS Kmp-11	mit NLS gekoppelter MIDGE kodierend für das Kmp-11 Antigen
pMCVp36	Plasmid kodierend für p36 LACK Antigen
20 pMCV TSA	Plasmid kodierend für TSA Antigen
pMCV gp63	Plasmid kodierend für gp63 Antigen
pMCV Kmp-11	Plasmid kodierend für Kmp-11 Antigen

Es zeigt:

- 25 **Fig. 1:** Die Entwicklung der Läsionen in Woche 8 nach der Belastungsinfektion in Mäusen. Hierin bedeuten:

L+K: LACK in Kombination mit Kmp-11
 L+T: LACK in Kombination mit TSA
 L+G: LACK in Kombination mit gp 63

- 10 -

K+T: Kmp-11 in Kombination mit TSA

K+G: Kmp-11 in Kombination mit gp 63

T+G: TSA in Kombination mit gp 63

- 5 T+G+L: TSA in Kombination mit gp 63 und LACK
 T+G+K: TSA in Kombination mit gp 63 und Kmp-11
 L+K+G: LACK in Kombination mit Kmp-11 und gp 63
 L+K+T: LACK in Kombination mit Kmp-11 und TSA

- 10 T+G+L+K: TSA in Kombination mit gp 63, LACK und Kmp-11

PBS: Kontroll Gruppe: PBS

- 15 Die Fig. 1 zeigt die verschiedenen Kombinationen der eingesetzten Antigene in Mäusen. Die dortigen Punkte repräsentieren die Daten der einzelnen Tiere, während die waagerechten Balken den Mittelwert der entsprechenden Gruppe kennzeichnen. Die betreffenden Antigene wurden jeweils einzeln, in sechs verschiedenen Zweierkombinationen, in vier verschiedenen Dreierkombinationen und in einer Viererkombination eingesetzt. As relevanter Parameter für den klinischen Erfolg der Impfung wurde das Wachstum der infektionsbedingten Läsionen in der infizierten Hinterpfote der Tiere gemessen. Die Größenzunahme der Läsionen ist auf der Ordinate in Millimeter aufgetragen. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Antigenkombinationen dargestellt. Dabei zeigt sich, dass in der Gruppe der Zweierkombinationen die Kombination von TSA mit gp 63 den besten Impfschutz bietet. Den nächst-
- 20 besten Schutz bietet die Kombination LACK mit TSA. In der Gruppe der Dreierkombination bietet die Gruppe LACK, Kmp-11, TSA den besten Schutz. Die erreichte Impfwirkung zeigt sich in der deutlich verringerten Größe der gebildeten Läsionen. Den zweitbesten Impfschutz bietet die Kombination der Antigene TSA, gp 63 und Kmp-11. In dieser Gruppe wird im Mittel
- 25 eine Läsionsgröße von 0,4 Millimeter erreicht. Der Wert von 0,5 Millimeter stellt jedoch den Schwellenwert dar, ab dem Läsionen für das menschliche Auge deutlich wahrnehmbar und auswertbar sind. Das bedeutet, dass die
- 30 Tiere, die mit der Kombination TSA, gp 63 und Kmp-11 wurden, per Definition keine Läsionen zeigten bzw. die festgestellten unter der Nachweisgrenze

lagen. Im Vergleich dazu weisen die unbehandelten Mäuse der Kontrollgruppe eine Läsionsgröße von 1,7 Millimetern im Durchschnitt auf. Ebenso trat bei diesen Tieren eine starke Schwellung und Rötung der Pfoten auf, Symptome, die ebenfalls nicht in den geschützten Gruppen zu beobachten waren und deutliche Entzündungszeichen infolge der Infektion darstellen.

Fig. 2: Die Bestimmung des Gesamt IgG Titer im Zieltier Hund vor der Belastungsinfektion mit *Leishmania infantum* Promastigoten. Hierin bedeuten:

- Gruppe 1: MIDGE-NLSp36 LACK
- Gruppe 2: MIDGE-NLS 4-Antigen-Kombination
- Gruppe 3: Plasmid 4-Antigen-Kombination
- Gruppe 4: Kontroll-Gruppe: PBS

Die Punkte repräsentieren die Daten der einzelnen Hunde, während die waagerechten Balken den Mittelwert der entsprechenden Gruppe kennzeichnen. Die optische Dichte (OD) steigt mit der Konzentration der Serum-Antikörper. In Figur 2 ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Konzentrationen der Anti-*Leishmania*-Antikörper der Gruppen 1 und 2 einerseits und den Gruppen 3 und 4 andererseits sichtbar. Die Hunde der Gruppe 1, die mit MIDGE-NLS-LACK geimpft wurden, und die Hunde der Gruppe 2, die die Kombination der vier Antigen-Sequenzen in MIDGE-NLS erhalten hatten, besaßen mehr Antikörper gegen *Leishmania infantum* als die Gruppen 3 und 4. Bemerkenswert ist, daß in Gruppe 3 keine Antikörper nachweisbar waren, obwohl die gleichen Antigen-Sequenzen wie in Gruppe 2 verwendet wurden. Dies zeigt, daß die Kombination der vier Antigensequenzen besonders in Verbindung mit MIDGE-NLS-Vektoren zur Induktion einer humoralen Immunantwort geeignet ist. Auch im Vergleich zur Gruppe 1 besaßen die Hunde der Gruppe 2 durchschnittlich mehr Antikörper. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Kombination der vier Antigene einen Vorteil gegenüber der alleinigen Verabreichung von LACK darstellt.

Im Folgenden wird näher auf die Versuchsergebnisse eingegangen; im Einzelnen:

- 30 In einem Impfversuch in Mäusen wurden verschiedene Kombinationen der eingesetzten Antigene auf ihre Wirksamkeit, einen möglichst hohen Schutz gegen Infekti-

- 12 -

onen mit Leishmaniose zu erreichen, getestet. Als Parameter für eine erzielte Schutzwirkung wurde die Unterdrückung des Läsionswachstums durch die eingesetzten Vakzinekombinationen benutzt. Zur Beurteilung der Schutzwirkung wurde eine Belastungsinfektion mit *Leishmania infantum* Promastigoten durchgeführt. Die

5 Beurteilung des Läsionswachstums erfolgte wöchentlich. Die Ergebnisse in Figur 1 stammen aus Woche acht nach der Belastungsinfektion. Grundsätzlich entwickelten alle Tiere, die mit einem Antigen oder einer Zweierkombination der Antigene geimpft wurden, früher Läsionen als die Tiere, die mit einer Dreier- oder Viererkombination der Antigene geimpft wurden. Ein guter Impferfolg wurde mit der Dreikombination

10 der Antigene Kmp-11, TSA und p36 LACK erreicht. Eine vergleichbare Schutzwirkung wurde mit der Antigenkombination TSA, gp63 und Kmp-11 erreicht. Der überraschende Impferfolg wird darin sichtbar, dass bei beiden erfolgreichen Dreierkombinationen (TSA, gp 63, Kmp-11 und p36 LACK, Kmp-11, gp 63) die Größe der Läsionen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,5 Millimetern liegen und sich somit keine

15 auswertbaren Läsionen entwickelten. Damit ist die Läsionsgröße bei den geimpften Tieren um 100% kleiner als bei der ungeimpften Kontrollgruppe.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Antigenkombinationen in einem Immunisierungsversuch in Mäusen.

<u>Gruppe</u>	<u>Anzahl Tiere</u>	<u>Menge an DNA [in Mikrogram]</u>
1. MIDGE-NLS-p36 LACK+Kmp-11	9	50
2. MIDGE-NLS-p36 LACK+TSA	9	50
3. MIDGE-NLS-p36 LACK+gp 63	9	50
4. MIDGE-NLS-Kmp11+TSA	9	50
5. MIDGE-NLS-Kmp11+gp 63	9	50
6. MIDGE-NLS-TSA+gp 63	9	50
7. MIDGE-NLS-TSA+gp 63+p36 LACK	9	50
8. MIDGE-NLS TSA+gp 63+p36 LACK+Kmp-11	9	50
9. MIDGE-NLS p36 LACK	9	50
10. MIDGE-NLS TSA	9	50
11. MIDGE-NLS Kmp-11	9	50
12. MIDGE-NLS gp 63	9	50

- 13 -

13. MIDGE-NLS TSA+gp 63+Kmp-11	9	50
14. MIDGE-NLS p36 LACK+Kmp-11+gp 63	9	50
15. MIDGE-NLS p36 LACK+Kmp-11+TSA	9	50
17. PBS	9	50

- Je Gruppe wurden neun weibliche Balb/c Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden mit 50 Mikrogramm DNA geimpft. In den Antigenkombinationen betrug die Menge an eingesetzter DNA 50 Mikrogramm pro Antigen. Nach zwei Wochen erfolgte die Zweitimmunisierung (boost). Drei Wochen nach dem Boost erfolgte die Belastungs-
- 5 infektion mit 5×10^4 *Leishmania infantum* Promastigoten, die sich in der stationären metazyklischen Phase befanden. Diese wurden den Tieren subkutan in die rechte Hinterpfote injiziert. Der Stand der Infektion wurde wöchentlich verfolgt. Die Größe der Läsionen wurde mit einer elektronischen Schiebelehre durch Vergleich mit der linken unbehandelten Hinterpfote bestimmt. In einem Folge-Experiment in weibli-
- 10 chen 4-12 Monate alten Beagle Hunden wurden ebenfalls verschiedene Impfstoffzusammensetzungen formuliert, die sich in der verwendeten Antigenkombination unterschieden. Die Negativkontrolle, Gruppe 4, erhielt nur PBS-Puffer und diente als Infektionskontrollgruppe. Die Gruppe 1 bestand aus nur einem Antigen, dem p36 LACK Antigen. Dieses Antigen hat in früheren Versuchen zu gutem Schutz geführt
- 15 und sollte im Zieltier Hund überprüft werden (L. Lopez-Fuertes et al., 2002, Vaccine 21: 247-257). Die Gruppe 3 bestand aus verschiedenen Plasmiden kodierend für die *Leishmania infantum* Antigene: TSA, Kmp-11, gp63 und p36 LACK. Diese Gruppe dient zum Vektor- und Wirkungsvergleich mit Gruppe 2, die aus dergleichen Antigenkombination bestand, jedoch peptidgekoppelte MIDGE als Vektoren beinhaltet.
- 20 Es wurden 4 Impfgruppen mit jeweils 6 Tieren zusammengestellt, die in 15-tägigem Abstand viermal intradermal mit jeweils 200 Mikrogramm DNA pro Konstrukt immunisiert wurden (siehe Tabelle 3). Vor dem Beginn des Experimentes und nach jeder Immunisierung wurde den Tieren, neben routinemäßigen veterinärmedizinischen Untersuchungen, Blut für serologische Untersuchungen abgenommen.
- 25 Um festzustellen, welcher Art der Immunantwort durch die Impfung oder eine Infektion erzeugt wurde, sind verschiedene Methoden anwendbar. Zu den Methoden, die den Rückschluss auf eine zelluläre Immunantwort zulassen, gehört der Test auf "verzögerte Überempfindlichkeit" der auch als "Delayed Type Hypersensitivity"-Test

(DTH-Test) bezeichnet wird. Durch Messung der Hautdicke an der Injektionsstelle 72 Stunden nach der Antigen-Applikation kann relativ genau bestimmt werden, ob eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion und damit eine spezifische T-Zell-Reaktion auf das Antigen erfolgte. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2

<u>Gruppe</u>	<u>Hunde</u>	<u>DTH-Test</u> <u>vor Impfung</u>	<u>DTH-Test</u> <u>nach Impfung</u>
MIDGE-NLSp36 LACK	1	-	+
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	+
	5	-	-
	6	-	-
MIDGE-NLS TSA, p36, Kmp11, gp36	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+ (?)
	4	-	-
	5	-	+
	6	-	+
Plasmid TSA, p36 LACK, Kmp11, gp36	1	-	+
	2	-	+
	3	-	-
	4	-	++
	5	-	-
	6	-	+
PBS Puffer	1	-	-
	2	+	-
	3	-	+
	4	-	+ (?)
	5	-	- (?)
	6	-	-

Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse des Tests auf "verzögerte Überempfindlichkeit" der auch als "Delayed Type Hypersensitivity"-Test (DTH-Test) bezeichnet wird. Eine lokale Hautschwellung wird als positiver DTH-Test bewertet (in der Abbildung mit "+" oder "++" gekennzeichnet) und zeigt an, daß das betreffende Tier antigen-spezifische T-Gedächtniszellen infolge der Impfung ausgebildet und somit eine zelluläre Immunantwort stattgefunden hat. Wie beschrieben ist die zelluläre Immunantwort entscheidend in der Prophylaxe und Therapie von Leishmaniose Erkrankungen. Vor Beginn des Experimentes wurde der DTH durchgeführt, um sicherzustellen, dass keines der Versuchstiere bereits eine zelluläre Immunantwort gegen *L. infantum* infolge einer früheren Infektion/Impfung ausgebildet hatte. Alle Tiere, bis auf eines, reagierten im DTH Test negativ und erfüllten damit die Voraussetzung für den Versuch. Eine positive Reaktion nach Abschluß der Immunisierung bedeutet, dass die Immunisierung eine spezifische zelluläre Immunantwort gegen *Leishmania infantum* erzeugt hat. Das ist als Impferfolg zu werten und läßt einen besseren Schutz gegen Infektionen erwarten.

Nach der letzten Impfung wurde wieder ein DTH Test durchgeführt. Hier erwartete man, dass möglichst alle geimpften Tiere positiv reagierten. Da das zuvor positive Tier nun negativ reagierte, ist davon auszugehen, dass es auch schon in dem ersten DTH Test negativ war und es sich um einen Fehler in der Interpretation des Ergebnisses handelte.

Die durch die Impfungen erzeugte Immunantwort wurde zusätzlich durch serologische Untersuchungen charakterisiert. In Fig. 2 sind die Ergebnisse des ELISA-Nachweises von spezifischen Antikörpern gegen *Leishmania infantum* im Serum der immunisierten Hunde dargestellt. Insgesamt waren die Antikörperkonzentrationen in den Seren der geimpften Hunde nicht sehr hoch. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die Immunisierung mehr auf eine zelluläre als auf eine humorale Immunantwort abzielte.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Impfgruppen im Immunisierungsversuch gegen *Leishmania infantum* in Hunden

<u>Gruppe</u>	<u>Verwendetes Antigen</u>	<u>Anzahl Tiere</u>	<u>Menge an DNA</u>	<u>Appliziertes Volumen</u>
1	MIDGE-NLSp36 LACK	6	200 µg pro Konstrukt	500 µl pro Tier
2	MIDGE-NLS-TSA, MIDGE-NLS-Kmp-11, MIDGE-NLS-gp63, MIDGE-NLS-p36 LACK	6	200 µg pro Konstrukt	500 µl pro Tier
3	pMCV-TSA, pMVC-Kmp-11, pMCV-gp63, pMCV-p36 LACKMIDGE	6	200 µg	500 µl pro Tier
4	PBS Puffer	6	-	500 µl pro Tier

Der Erfolg der Immunisierung wird beschreibbar durch eine Belastungsreaktion der Tiere mit dem Erreger. Vier Wochen nach der letzten Immunisierung fand deshalb

5 intravenös eine Belastungsinfektion mit 5×10^7 *Leishmania infantum* Promastigoten statt. Der Grad der Infektion und damit der durch die Impfung erreichte Schutz, wird anhand klinisch-pathologischer Untersuchungen festgestellt. Zu diesen zählen die

10 Untersuchung auf Schwellung der Lymphknoten in der Kniekehle, Gewichtsverlust, Rückbildung mit einhergehender Veränderung der Farbe der Muskeln, überschießendes Nagelwachstum, Läsionen der Haut sowie Veränderungen im Hämogramm. Das Vorhandensein und die Quantität des Erregers werden durch eine quantitative PCR-Reaktion bestimmt. Bei Vergleich der Gruppen 11 Monate nach der Belastungsinfektion in Bezug auf die Ausbildung klinischer Symptome ergibt sich folgendes Bild: Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen Gruppe 2 und der Kontrollgruppe

15 erkennbar. In Gruppe 2 erkrankte nur 1 Hund an Leishmaniose, während in der Kontrollgruppe 4 von 6 Hunden an Leishmaniose erkrankten. Auch in der Gruppe 1 war die Anzahl erkrankter Hunde gegenüber der Kontrollgruppe deutlich reduziert, während Gruppe 3 nur einen geringen Unterschied zur Kontrollgruppe aufwies. Der direkte Vergleich der Wirkung von MIDGE-NLS mit Plasmid kodierend für exakt die

20 gleichen Antigene, (Gruppe 2 und Gruppe 3) zeigt, das mit MIDGE-NLS ein besse-

- 17 -

- rer Schutz gegen Leishmaniose erzielt wurde, als es mit Plasmid möglich war. Die Versuchsergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Immunisierung von Hunden gegen Leishmaniose mit einer Kombination aus den vier MIDGE –NLS kodierten Antigenen, die Entwicklung klinischer Symptome der Leishmaniose in Hunden verhindern kann. Nach dem Erkenntnisstand der Anmelder ist ein vergleichbar gutes Ergebnis, wie es mit dem erfindungsgemäßen Impfstoff MIDGE-NLS kodierend für 4 Antigene erzielt wurde, bisher nur von Ramiro et al., (Vaccine 3696, 2003: 1-11) beschrieben worden. Im Unterschied zu MIDGE-NLS ist jedoch in der Studie von Ramiro et al., ein rekombinanter Vaccinia Virus (rVV) als Boostimpfstoff verwendet worden. Bei dem rekombinanten Vaccinia Virus handelt es sich um genetisch modifizierte Viren, die bekanntermaßen ein hohes Sicherheitsrisiko darstellen (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518).

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Klonierung des Plasmids pMCVp36

- 15 Vom Ausgangsplasmid pSCp36 wurden 2 Fragmente mittels PCR amplifiziert:

1. PCR ca. 800 bp;

Primer links: 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT

Primer rechts: 5'-TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTCTTCCGTCCG

2. PCR ca. 950 bp;

- 20 Primer links: 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT,

Primer rechts: 5'-TTATATGAGCTCTTACTCGGCCGTCGGAGATGG

Das PCR-Produkt aus der 2. PCR wurde mit Eco31I geschnitten und das kleinere Fragment (ca. 200 bp) isoliert.

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde mit BpII geschnitten.

Das 200 bp Fragment und das geschnittene Fragment aus der 1. PCR wurden zusammenligiert und anschließend mit KpnI und SacI geschnitten und in den mit KpnI und SacI geschnittenen pMOK-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen pMCVp36.

5 Beispiel 2: Klonierung des Plasmids pMCVKmp-11

Das Gen wurde mittels PCR aus cDNA von Leishmania infantum amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach Verdau mit KpnI und XhoI in den ebenso geschnittenen Vektor pMCV1.4 kloniert und sequenziert. Das entstandene Plasmid wurde pMCVKpm11 genannt.

- 10 Primer links: 5'-ATTATAGGTACCATGGCCACCACGTACGAG
Primer rechts : 5'-TTAATTCTCGAGTTACTTGGATGGGTACTGCG

Beispiel 3: Klonierung des Plasmids pMCVTSA

- 15 Das Gen wurde mittels PCR aus cDNA von Leishmania infantum amplifiziert und durch Einfügen eines Basenaustausches, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern, eine Eco31I-Erkennungssequenz entfernt. Das abschließende PCR-Produkt wurde nach Verdau mit KpnI und XhoI in den ebenso geschnittenen Vektor pMCV1.4 kloniert und sequenziert. Das entstandene Plasmid wurde pMCVTSA genannt.

- linker Primer: 5'-AATTATGGTACCATGTCCTGCGGTAACGCCAAGATC
20 rechter Primer: 5'-AATATACTCGAGTTACTGCTTGCTGAAGTATCCTTCGAC

linker Mutationsprimer: 5'-TACCGCGGTCTCTTCATCATCG
rechter Mutationsprimer: 5'-ATTGGGGGTCTCGATGAATAGACCGCGGTAGG

Beispiel 4: Klonierungsstrategie für die Codon-Usage Optimierung von gp63

- 25 Die Oligonukleotide wurden mit einer Länge zwischen 18 und 28 Basen bestellt (MWG Biotech). Zweimal 90 Oligonukleotide, die jeweils den Vorwärts- und Rückwärtsstrang abbilden, wurden durch Annealing und Ligation miteinander verbunden. Die annealten Oligonukleotide erzeugten jeweils zwei 4-Basen Überhänge. Es wur-

- 19 -

de darauf geachtet, dass die Überhänge nur einmal vorkamen und nicht palindromisch waren. Die Oligonukleotide wurden annealt, indem die beiden einzelnen Oligonukleotide (Strang und Gegenstrang) mit Kinasepuffer versetzt auf ca. 80°C erhitzt wurden und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Danach

5 wurde ATP und Polynukleotidkinase (PNK) zugegeben und die Oligonukleotide für eine Stunde phosphoryliert. Anschließend wurden im ersten Schritt jeweils benachbarte Oligonukleotide zusammengegeben und ligiert (Oligonukleotid 1+2, Oligonukleotid 3+4). Nach 1 h Ligation wurde ein Aliquot vom Ligationsansatz der Oligonukleotide 1+2 und ein Aliquot vom Ligationsansatz 3+4 zusammengegeben. Dies

10 wurde mit den verschiedenen Ligationsansätzen bis zu einer Länge des Ligationsproduktes von etwa 300bp durchgeführt. Ein Aliquot des jeweils letzten Ligationsschrittes wurde als Template in eine PCR mit flankierenden Primern eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde in den TOPO-TA-Cloning Vektor (Invitrogen) zwischenkloniert und sequenziert. Dies erfolgte mit insgesamt sechs Fragmenten des komplet-

15 ten Gens. Die sechs einzelnen Fragmente wurden aus dem zwischenklonierten Plasmid mit Eco31I ausgeschnitten und miteinander ligiert. Das gesamte Ligationsprodukt richtiger Länge wurde in einer abschließenden PCR amplifiziert, mit KpnI und Sac I verdaut, und in den ebenso geschnittenen Vektor pMCV1.4 nach Gelextraktion kloniert. Anschließend wurde die Sequenz durch Sequenzierung kontrolliert.

20 Das entstandene Plasmid wurde pMCVgp63 genannt.

Primer für die 6 zusammengesetzten Fragmente:

Fragment 1:

linker Primer: ATTATTGGTACCATGTCTGTGGACT

rechter Primer: TTATATGGTCTCTCTCAGGGCTCCCCAGTTG

25 Fragment 2:

linker Primer: ATTATAGGTCTCCTGAGAATTGCTGTGTCCACAGAG

rechter Primer: TTATATGGTCTCACAGAGGCCACATACACAA

Fragment 3:

linker Primer: TATTATGGTCTCCTCTGTGCCCTCTGAGGAGGGAGTGCTGGCC

30 rechter Primer: AATTATGGTCTCCTCAATCTCCAGGTACTCCAGG

- 20 -

Fragment 4:

linker Primer: ATTATAGGTCTCATTGAGGACCAGGGAGGAG

rechter Primer: TAATATGGTCTCGTGTCTGGTCACTCCACACTTG

Fragment 5:

5 linker Primer: ATTATAGGTCTCAGACACCCAGACCTGCCCC

rechter Primer: TTATATGGTCTCGGGGTGCAGTTGGCATAGCC

Fragment 6:

linker Primer: ATATATGGTCTCCACCCCAGGCCTGAGAGTGG

rechter Primer: TAATATGAGCTCCTACAGGGCCACAGCCAGCAGG

10 gesamte Sequenz:

linker Primer: ATTATTGGTACCATGTCTGTGGACT

rechter Primer: TAATATGAGCTCCTACAGGGCCACAGCCAGCAGG

Beispiel 5: Kopplung der NLS Sequenz an Oligonukleotide

Die NLS Kopplung wurden wie folgt vorgenommen: das NLS Peptid mit der Sequenz PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-dGGG AGT CCA GT xT TTC TGG AC (wobei xT für aminomodifizierte Thyminbase mit C₂ – Amminolinker steht, = ODN 1) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipitation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM MgCl₂, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der MIDGE-NLS Antigen Konstrukte verwendet.

Beispiel 6: Herstellung der MIDGE-NLSp36

MIDGE sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMCVp36 wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (= ODN 1) und 5'-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' (= ODN 2) durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I wurde durch Erhitzen auf 70°C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

Die Herstellung von MIDGE-NLS-TSA, -Kmp-11 und gp63 erfolgte analog.

Beispiel 7: DHT Test

Test auf "verzögerte Überempfindlichkeit" der auch als "Delayed Type Hypersensitivity"-Test (DTH-Test) bezeichnet wird. Bei diesem Test wird dem geimpften Tier eine sehr kleine Menge Antigen in die obersten Hautschichten verabreicht. Zuvor wird die Hautdicke an der Applikationsstelle genau gemessen. Anschließend beobachtet man, ob sich die Haut an der Injektionsstelle entzündlich verändert. Charakteristisch für eine durch sensibilisierte T-Zellen hervorgerufene Immunreaktion auf das Antigen ist eine Entzündungsreaktion, die erst nach 48 bis 72 Stunden nachweisbar ist. Die klinischen Symptome, wie lokale Hautschwellung, Rötung und eventuell Schmerzhaftigkeit, können auf die Wirkung von Zytokinen zurückgeführt werden. Eine lokale Hautschwellung wird als positiver DTH-Test bewertet (in der Tabelle 1 mit "+" oder "++" gekennzeichnet) und zeigt an, daß das betreffende Tier antigen-spezifische T-Gedächtniszellen infolge der Impfung ausgebildet hat.

Beispiel 8: Bestimmung Gesamt-Antikörper nach Immunisierung

In Fig. 2 sind die Ergebnisse des ELISA-Nachweises von spezifischen Antikörpern gegen *Leishmania infantum* im Serum der immunisierten Hunde dargestellt. Vor der

- 22 -

Belastungsinfektion wurden von allen Hunden die Seren gewonnen. Die Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter erfolgte mittels ELISA, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 406 \text{ nm}$ bestimmt wurde.

Patentansprüche

1. Verwendung eines DNA-Expressionskonstruktes zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, wobei besagtes DNA-Expressionskonstrukt ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen enthält, welche zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.
2. Verwendung von zwei oder drei DNA-Expressionskonstrukten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, wobei besagte DNA-Expressionskonstrukte jeweils ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, die gemeinsam zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei wenigstens zwei der *Leishmania infantum* Antigene als Fusionsprotein exprimiert werden.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei das Fusionsprotein das Expressionsprodukt aus *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA) und *kinetoplastid membrane protein 11 Gen* (Kmp-11), oder einer Kombination derselben, ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 und 1, wobei das Fusionsprotein das Expressionsprodukt aus *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 Gen und *kinetoplastid membrane protein 11 Gen* (Kmp-11), oder einer Kombination derselben, ist.
6. Verwendung nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei zusätzlich ein DNA-Expressionskonstrukt zur Expression des *Leishmania* Antigen p36 LACK oder eines Allels oder Derivates davon mit entsprechender Funktion enthalten ist.

- 5 7. Verwendung nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die kodierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schleifen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promotors und einer Terminatorsequenz bestehen.
- 10 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die kodierenden Polynukleotidsequenzen in einem zirkulär doppelsträngigen Expressionsvektor vorliegen.
- 15 9. Verwendung nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das DNA-Expressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem oder mehreren Oligopeptiden kovalent verknüpft ist.
10. Verwendung nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die DNA-Expressionskonstrukte jeweils mit einem Oligopeptid aus 3 bis 30 Aminosäuren konjugiert sind, wobei das Oligopeptid zur Hälfte aus basischen Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin besteht.
- 20 11. Verwendung nach 10, wobei die konjugierten Oligopeptide die Aminosäuresequenz YGRKKRRQRRR aufweisen.
- 25 12. Verwendung nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die linear-kovalent geschlossenen DNA-Expressionskonstrukte mit einem die Kernlokalisationssequenz (NLS) des large T-Antigens von SV40 enthaltenden Peptid mit der Aminosäuresequenz PKKKRKV modifiziert sind.
13. Verwendung der DNA-Expressionskonstrukte nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten.

14. Vakzine zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten, enthaltend ein Arzneimittel nach Anspruch 13.
15. Vakzine nach Anspruch 14, welche zusätzlich Adjuvantien und/oder immunstimulatorische Nukleinsäuresequenzen mit einem oder mehreren CpG-Motiven enthält.
16. Vakzine nach Anspruch 15, wobei die immunstimulatorische Nukleinsäuresequenzen als zirkulärer Strang Desoxyribonukleinsäure mit einer teilweise zueinander komplementären, antiparallelen Basensequenz vorliegen.
17. DNA-Expressionskonstrukt, enthaltend ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen, welche zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.
18. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 17, wobei die Genprodukte oder Allele oder Derivate davon mit entsprechender Funktion als ein singuläres Fusionsprotein exprimiert werden.
19. DNA-Expressionskonstrukt, enthaltend ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen, welche zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA) und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.
20. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 19, wobei die Genprodukte oder Allele oder Derivate davon mit entsprechender Funktion als ein singuläres Fusionsprotein exprimiert werden.
21. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei das Expressionskonstrukt als kovalent geschlossenes lineares Desoxyribonukleinsäuremoleküle vorliegt, welches einen linearen Doppelstrang-

- 5 bereich aufweist, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schleifen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promotors und einer Terminatorsequenz bestehen.
22. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei die kodierenden Polynukleotidsequenzen in einem zirkulär doppelsträngigen Expressionsvektor vorliegen.
- 10 23. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei das DNA-Expressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem oder mehreren Oligopeptiden kovalent verknüpft ist.
- 15 24. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 23, wobei das DNA-Expressionskonstrukt mit einem Oligopeptid aus 3 bis 30 Aminosäuren konjugiert ist, wobei das Oligopeptid zur Hälfte aus basischen Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin besteht.
25. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 24, wobei das konjugierte Oligopeptid die Aminosäuresequenz YGRKKRRQRRR aufweist.
- 20 26. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 23, wobei das linear-kovalent geschlossenen DNA-Expressionskonstrukte mit einem die Kernlokalisationssequenz (NLS) des large T-Antigens von SV40 enthaltenden Peptid mit der Aminosäuresequenz PKKKRKV modifiziert ist.
27. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Sequenz für gp63 kodon-optimiert ist.
- 25 28. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 27, enthaltend die Sequenz Seq.ID 5.

Fig. 1:

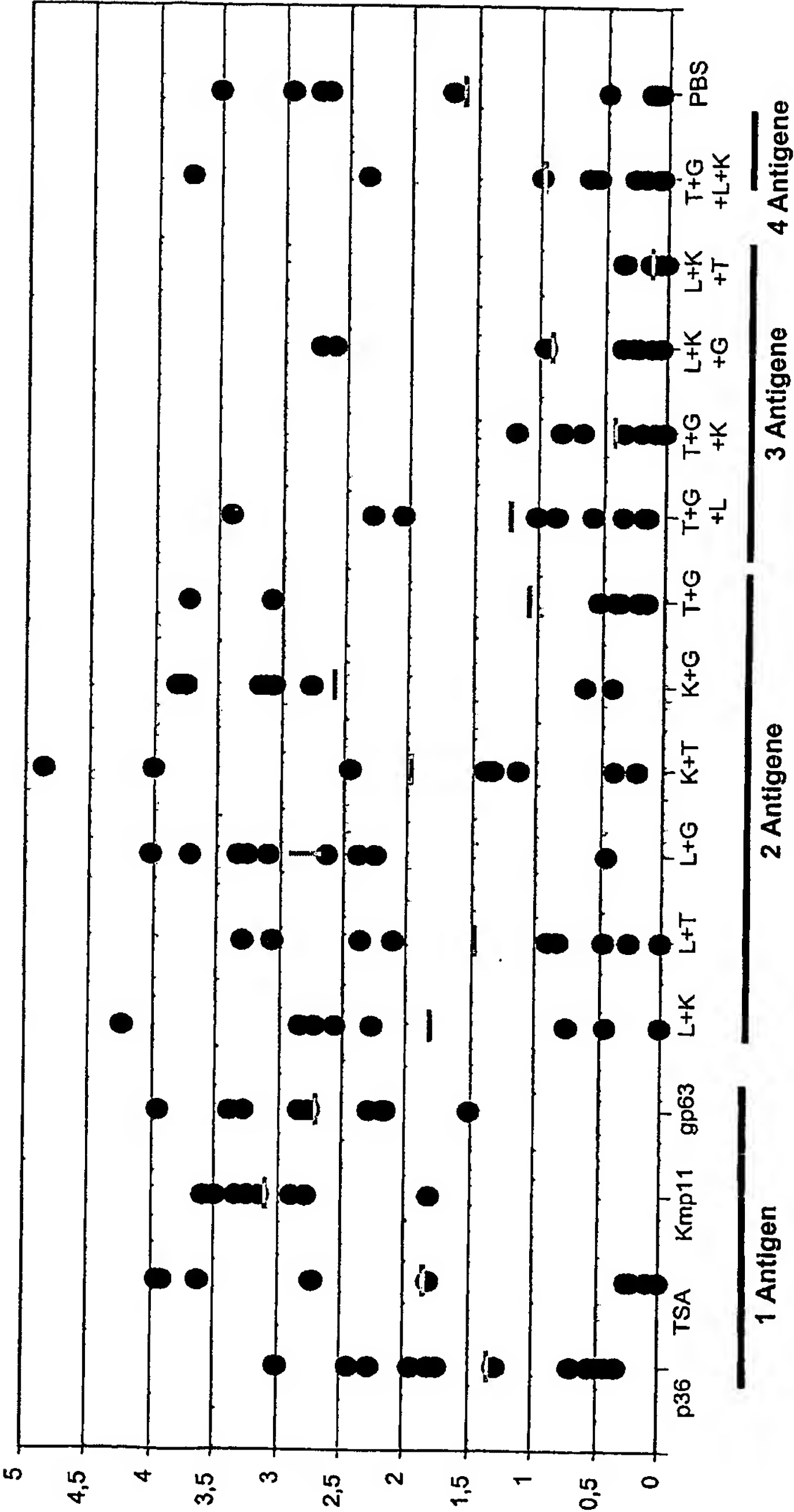
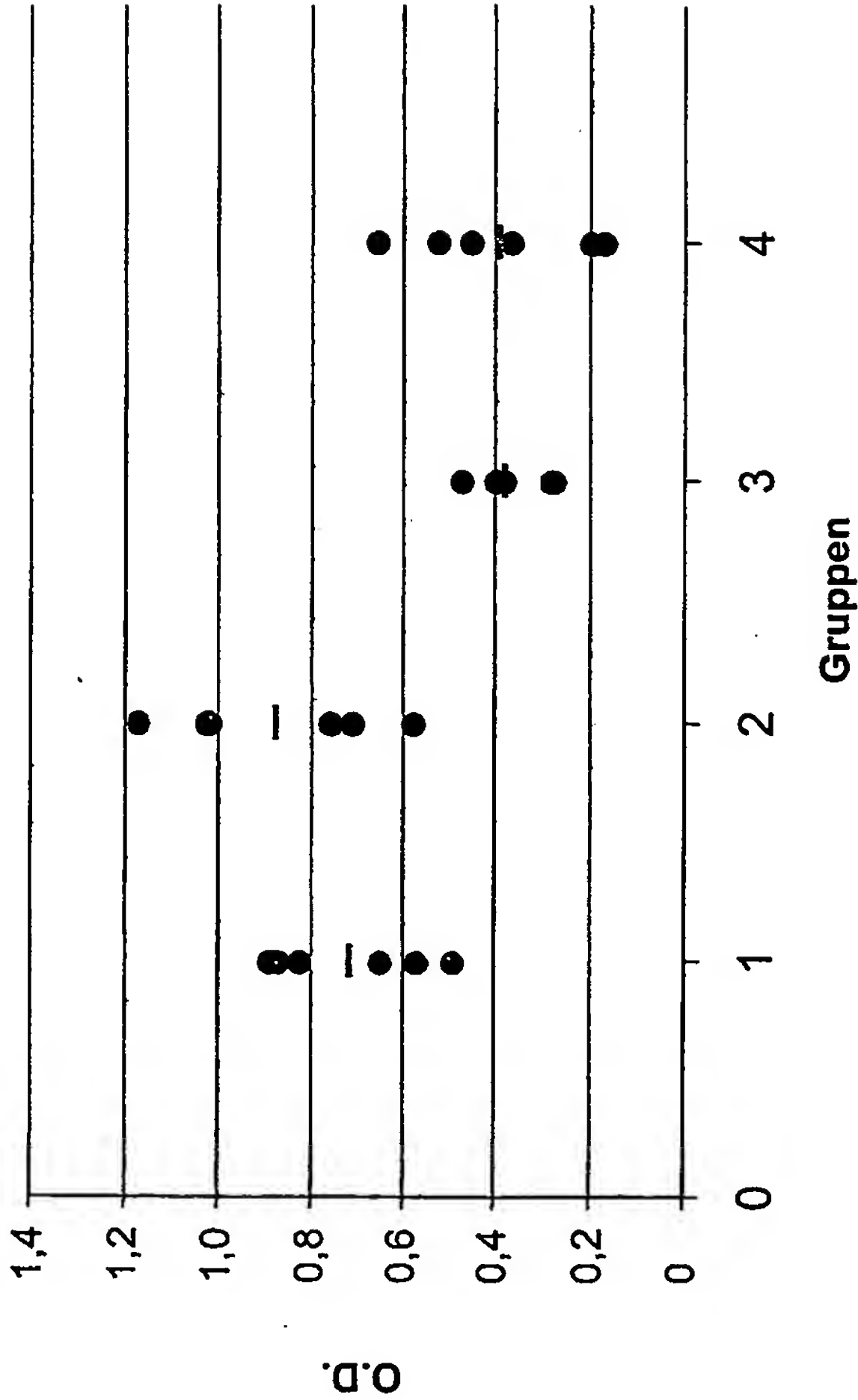


Fig. 2:



XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Mologen AG

<120> MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON INFEKTIONEN MIT LEISHMANIOSE

<130> XI 1827-03

<150> EP 03090368.6
<151> 2004-10-22

<150> EP 03090368.6
<151> 2003-10-22

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 279
<212> DNA
<213> Leishmania infantum

<220>
<221> misc_feature
<223> DNA Sequenz des Leishmania infantum kinetoplastid membrane protein 11 Gens (kmp-11)

<400> 1
atggccacca cgtacgagga gttttcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac 60
aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc tttgcggaca agccggatga gtcgacgctg 120
tcgccccgaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga acacacagag 180
aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240
ctcgagcagc agaaggctgc gcagtaccca tccaagtaa 279

<210> 2
<211> 92
<212> PRT
<213> Leishmania infantum

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Protein Sequenz des Leishmania infantum kinetoplastid membrane protein 11 (kmp-11)

<400> 2
Met Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Phe Ser Ala Lys Leu Asp Arg Leu Asp
1 5 10 15
Glu Glu Phe Asn Arg Lys Met Gln Glu Gln Asn Ala Lys Phe Phe Ala
20 25 30
Asp Lys Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Met Lys Glu His Tyr
35 40 45

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

Glu Lys Phe Glu Arg Met Ile Lys Glu His Thr Glu Lys Phe Asn Lys
50 55 60

Lys Met His Glu His Ser Glu His Phe Lys Gln Lys Phe Ala Glu Leu
65 70 75 80

Leu Glu Gln Gln Lys Ala Ala Gln Tyr Pro Ser Lys
85 90

<210> 3
<211> 600
<212> DNA
<213> Leishmania infantum

<220>
<221> misc_feature
<223> DNA Sequenz des Leishmania infantum Antigene thiol-specific
antioxidant protein Gens (TSA)

<400> 3
atgtcctgcg gtaacgcaa gatcaactgt cccgcgcgcg ccttcgagga ggtggcgctc 60
atgccaacg gcagcttcaa gaagatcagc ctgcgccctt acaagggcaa gtgggtcgtg 120
ctcttcttct acccgctcga cttcaccttc gtgtgccga cagagatcat cgcgttctcc 180
gaaaacgtga gtcgcttcaa cgagctcaac tgcgaggtcc tcgctgctc catggacagc 240
gagtacgcgc acctgcagtg gacgctgcag gaccgcaaga agggcggcct cggcgccatg 300
gcgattccaa tgctggccga caagaccaag agtatcgctc gtgcctacgg cgtgctggag 360
gagaaacagg gcgtggccta ccgcggtcta ttcattcatc accccaatgg catggtgcgc 420
cagatcaccg tcaacgacat gccggtgggc cgcaacgtgg aggaggttct gcgcctgctg 480
gaggcttttc agttcgtgga gaagcacggc gaggtgtgcc ccgcgaactg gaagaagggc 540
gccccacga tgaagccgga gccgaaggcg tctgtcgaag gatacttcag caagcagtaa 600

<210> 4
<211> 199
<212> PRT
<213> Leishmania infantum

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Protein DNA Sequenz des Leishmania infantum thiol-specific
antioxidant Proteins (TSA)

<400> 4

Met Ser Cys Gly Asn Ala Lys Ile Asn Cys Pro Ala Pro Pro Phe Glu
1 5 10 15

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt
 Glu Val Ala Leu Met Pro Asn Gly Ser Phe Lys Lys Ile Ser Leu Ala
 20 25 30

Ala Tyr Lys Gly Lys Trp Val Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe
 35 40 45

Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Glu Asn Val Ser
 50 55 60

Arg Phe Asn Glu Leu Asn Cys Glu Val Leu Ala Cys Ser Met Asp Ser
 65 70 75 80

Glu Tyr Ala His Leu Gln Trp Thr Leu Gln Asp Arg Lys Lys Gly Gly
 85 90 95

Leu Gly Ala Met Ala Ile Pro Met Leu Ala Asp Lys Thr Lys Ser Ile
 100 105 110

Ala Arg Ala Tyr Gly Val Leu Glu Glu Lys Gln Gly Val Ala Tyr Arg
 115 120 125

Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Asn Gly Met Val Arg Gln Ile Thr Val
 130 135 140

Asn Asp Met Pro Val Gly Arg Asn Val Glu Glu Val Leu Arg Leu Leu
 145 150 155 160

Glu Ala Phe Gln Phe Val Glu Lys His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn
 165 170 175

Trp Lys Lys Gly Ala Pro Thr Met Lys Pro Glu Pro Lys Ala Ser Val
 180 185 190

Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Gln
 195

<210> 5
 <211> 1800
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> DNA Sequenz des codon-optimierten Leishmania infantum Antigen
 gp63

<400> 5
 atgtctgtgg actcctcctc cacccacaga cacagatctg tggctgccag actggtgaga 60
 ctggctgcag ctggagctgc tgtgattgct gctgtgggca cagctgctgc ctgggcccac 120
 gctggagctg tgcagcacag atgcatccat gatgccatgc aggccagagt gagacagtct 180

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

gtggccagac accacacagc cccaggagct gtgtctgctg tgggcctgcc ctatgtgacc	240
ctggacacag ctgcagctgc agacagaaga ccaggctctg cccccacagt ggtgagagct	300
gccaaactggg gagccctgag gattgctgtg tccacagagg acctgacaga cccagcctac	360
cactgtgcca gagtgggcca gcacatcaag agaagactgg gaggagtgga catctgcaca	420
gctgaggaca tcctgacaga tgagaagaga gacatcctgg tgaagcacct gatccccag	480
gccctgcagc tgcacacaga gagactgaaa gtgagacagg tgcaggacaa gtggaagggtg	540
acaggcatgg gagatgatgt gtgctctgac ttcaagggtgc cccagccca catcacagat	600
ggcctgtcca acacagactt tgtgatgtat gtgacctctg tgccctctga ggagggagtg	660
ctggcctggg ccaccatctg ccagggtgtc tctgatggcc acccaaccgt gggagtgate	720
aacatcccag ctgccaacat tgcctccaga tatgaccagc tggtgaccag agtggtgacc	780
catgagatgg cccatgccct gggcttctct gtgggcttct ttgagggagc cagaatcctg	840
gagtccatct ccaatgtgag acacaaggac tttgatgtgc cagtgatcaa ctccctccact	900
gctgtggcca aggccagaga gcagtatggc tgtgacaccc tggagtacct ggagattgag	960
gaccagggag gagctggctc tgctggctcc cacatcaaga tgagaaatgc ccaggatgag	1020
ctgatggccc cagctgcagc tgcaggctac tactctgccc tgaccacggc catcttccag	1080
gacctgggct tctaccaggc tgacttctcc aaggctgagg tgatgccctg gggcagaaat	1140
gctggctgtg ccttccctgtc tgagaagtgc atggagagaa acatcaccca gtggccagcc	1200
atgttctgca atgagaatga ggtgaccatg agatgcccc cctccagact gtccctgggc	1260
aagtgtggag tgaccagaca cccagacctg cccccctact ggcagtactt cacagacccc	1320
tccctggctg gcatctctgc cttcatggac tgctgcccag tggcggagcc ctatggagat	1380
ggctcctgtg cccagagagc ctctgaggct ggagccccct tcaagggtt caatgtgttc	1440
tctgatgctg cccgatgcat tgatggagcc ttcagaccca agacctcca tggcatcatc	1500
aagtcctatg ctggcctgtg tgccaatgtg agatgtgaca cagccaccag aacctactct	1560
gtgcagggtgc atggaggctc tggctatgcc aactgcaccc caggcctgag agtggagctg	1620
tccacagtgt cctctgcctt tgaggaggga ggctacatca cctgcccccc ctatgtggag	1680
gtgtgccagg gcaatgtgca ggctgccaag gatggaggca atgcagctgc tggcagaaga	1740
ggccccagag ctgctgccac agccctgctg gtggctgccc tgctggctgt ggccctgtag	1800

<210> 6
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Protein Sequenz des codon-optimierten Leishmania infantum Antigen
 gp63

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<400> 6

```

Met Ser Val Asp Ser Ser Ser Thr His Arg His Arg Ser Val Ala Ala
1          5          10          15

Arg Leu Val Arg Leu Ala Ala Ala Gly Ala Ala Val Ile Ala Ala Val
20          25          30

Gly Thr Ala Ala Ala Trp Ala His Ala Gly Ala Val Gln His Arg Cys
35          40          45

Ile His Asp Ala Met Gln Ala Arg Val Arg Gln Ser Val Ala Arg His
50          55          60

His Thr Ala Pro Gly Ala Val Ser Ala Val Gly Leu Pro Tyr Val Thr
65          70          75          80

Leu Asp Thr Ala Ala Ala Ala Asp Arg Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr
85          90          95

Val Val Arg Ala Ala Asn Trp Gly Ala Leu Arg Ile Ala Val Ser Thr
100         105         110

Glu Asp Leu Thr Asp Pro Ala Tyr His Cys Ala Arg Val Gly Gln His
115         120         125

Ile Lys Arg Arg Leu Gly Gly Val Asp Ile Cys Thr Ala Glu Asp Ile
130         135         140

Leu Thr Asp Glu Lys Arg Asp Ile Leu Val Lys His Leu Ile Pro Gln
145         150         155         160

Ala Leu Gln Leu His Thr Glu Arg Leu Lys Val Arg Gln Val Gln Asp
165         170         175

Lys Trp Lys Val Thr Gly Met Gly Asp Asp Val Cys Ser Asp Phe Lys
180         185         190

Val Pro Pro Ala His Ile Thr Asp Gly Leu Ser Asn Thr Asp Phe Val
195         200         205

Met Tyr Val Thr Ser Val Pro Ser Glu Glu Gly Val Leu Ala Trp Ala
210         215         220

Thr Ile Cys Gln Val Phe Ser Asp Gly His Pro Thr Val Gly Val Ile
225         230         235         240

Asn Ile Pro Ala Ala Asn Ile Ala Ser Arg Tyr Asp Gln Leu Val Thr
245         250         255

```


XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

Arg Val Val Thr His Glu Met Ala His Ala Leu Gly Phe Ser Val Gly
260 265 270

Phe Phe Glu Gly Ala Arg Ile Leu Glu Ser Ile Ser Asn Val Arg His
275 280 285

Lys Asp Phe Asp Val Pro Val Ile Asn Ser Ser Thr Ala Val Ala Lys
290 295 300

Ala Arg Glu Gln Tyr Gly Cys Asp Thr Leu Glu Tyr Leu Glu Ile Glu
305 310 315 320

Asp Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala Gly Ser His Ile Lys Met Arg Asn
325 330 335

Ala Gln Asp Glu Leu Met Ala Pro Ala Ala Ala Gly Tyr Tyr Ser
340 345 350

Ala Leu Thr Thr Ala Ile Phe Gln Asp Leu Gly Phe Tyr Gln Ala Asp
355 360 365

Phe Ser Lys Ala Glu Val Met Pro Trp Gly Arg Asn Ala Gly Cys Ala
370 375 380

Phe Leu Ser Glu Lys Cys Met Glu Arg Asn Ile Thr Glu Trp Pro Ala
385 390 395 400

Met Phe Cys Asn Glu Asn Glu Val Thr Met Arg Cys Pro Thr Ser Arg
405 410 415

Leu Ser Leu Gly Lys Cys Gly Val Thr Arg His Pro Asp Leu Pro Pro
420 425 430

Tyr Trp Gln Tyr Phe Thr Asp Pro Ser Leu Ala Gly Ile Ser Ala Phe
435 440 445

Met Asp Cys Cys Pro Val Ala Glu Pro Tyr Gly Asp Gly Ser Cys Ala
450 455 460

Gln Arg Ala Ser Glu Ala Gly Ala Pro Phe Lys Gly Phe Asn Val Phe
465 470 475 480

Ser Asp Ala Ala Arg Cys Ile Asp Gly Ala Phe Arg Pro Lys Thr Ser
485 490 495

His Gly Ile Ile Lys Ser Tyr Ala Gly Leu Cys Ala Asn Val Arg Cys
500 505 510

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

Asp Thr Ala Thr Arg Thr Tyr Ser Val Gln Val His Gly Gly Ser Gly
 515 520 525

Tyr Ala Asn Cys Thr Pro Gly Leu Arg Val Glu Leu Ser Thr Val Ser
 530 535 540

Ser Ala Phe Glu Glu Gly Gly Tyr Ile Thr Cys Pro Pro Tyr Val Glu
 545 550 555 560

Val Cys Gln Gly Asn Val Gln Ala Ala Lys Asp Gly Gly Asn Ala Ala
 565 570 575

Ala Gly Arg Arg Gly Pro Arg Ala Ala Ala Thr Ala Leu Leu Val Ala
 580 585 590

Ala Leu Leu Ala Val Ala Leu
 595

<210> 7
 <211> 939
 <212> DNA
 <213> Leishmania infantum

<220>
 <221> misc_feature
 <223> DNA Sequenz Leishmania Antigen p36 (LACK).

<400> 7
 atgaactacg agggtcacct gaagggccac cgcgatggg tcacctccct ggcctgcccg 60
 cagcaggcgg ggtcgtagat caaggtgggtg tcgacgtcgc gcgatggcac ggccatctcg 120
 tggaaagcca accccgaccg ccacagcgtg gacagcgact acggtctgcc gagccaccgc 180
 ctcgagggcc acaccggctt cgtgtcgtgt gtgtcgtggtg cccacgccac cgactacgcg 240
 ctgaccgcgt cctgggaccg ctccatccgc atgtgggacc tgcgcaatgg ccagtgccag 300
 cgcaagttcc tgaagcacac caaggacgtg ctgcgcgtcg ccttctcgcc ggacgaccgc 360
 ctgatcgtgt ccgcgggccc cgacaacgtg atccgcgtgt ggaacgtggc gggcgagtgc 420
 atgcacgagt tcctgcgcga cggccacgag gactgggtga gcagcatctg tttctcgccg 480
 tcgctggagc atccgatcgt ggtgtccggc agctgggaca acaccatcaa ggtatggaac 540
 gtgaacgggg gcaagtgtga gcgcacgctc aagggccaca gcaactacgt gtccacgggtg 600
 acggtgtcgc cagacgggtc gctgtgcgcg tccggcggca aggacggcgc ggcgctgctg 660
 tgggacctga gcaccggcga gcagctgttc aagatcaacg tggagtcgcc catcaaccag 720
 atcgcccttct cgcccaaccg cttctggatg tgcgtcgcga cggagaggte cctgtccgtg 780
 tacgacctgg agagcaaggc tgtgattgcg gagctgacgc cggacggcgc gaagccgtcc 840

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

gagtgcattc ccattgcctg gtccgccgac ggcaacactc tgtactccgg tcacaaggac 900
 aacctgatcc gcgtgtggtc catctccgac gccgagtaa 939

<210> 8
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <223> Protein Sequenz Leishmania Antigen p36 (LACK)

<400> 8

Met Asn Tyr Glu Gly His Leu Lys Gly His Arg Gly Trp Val Thr Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Cys Pro Gln Gln Ala Gly Ser Tyr Ile Lys Val Val Ser Thr
 20 25 30

Ser Arg Asp Gly Thr Ala Ile Ser Trp Lys Ala Asn Pro Asp Arg His
 35 40 45

Ser Val Asp Ser Asp Tyr Gly Leu Pro Ser His Arg Leu Glu Gly His
 50 55 60

Thr Gly Phe Val Ser Cys Val Ser Leu Ala His Ala Thr Asp Tyr Ala
 65 70 75 80

Leu Thr Ala Ser Trp Asp Arg Ser Ile Arg Met Trp Asp Leu Arg Asn
 85 90 95

Gly Gln Cys Gln Arg Lys Phe Leu Lys His Thr Lys Asp Val Leu Ala
 100 105 110

Val Ala Phe Ser Pro Asp Asp Arg Leu Ile Val Ser Ala Gly Arg Asp
 115 120 125

Asn Val Ile Arg Val Trp Asn Val Ala Gly Glu Cys Met His Glu Phe
 130 135 140

Leu Arg Asp Gly His Glu Asp Trp Val Ser Ser Ile Cys Phe Ser Pro
 145 150 155 160

Ser Leu Glu His Pro Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp Asn Thr Ile
 165 170 175

Lys Val Trp Asn Val Asn Gly Gly Lys Cys Glu Arg Thr Leu Lys Gly
 180 185 190

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

His Ser Asn Tyr Val Ser Thr Val Thr Val Ser Pro Asp Gly Ser Leu
 195 200 205

Cys Ala Ser Gly Gly Lys Asp Gly Ala Ala Leu Leu Trp Asp Leu Ser
 210 215 220

Thr Gly Glu Gln Leu Phe Lys Ile Asn Val Glu Ser Pro Ile Asn Gln
 225 230 235 240

Ile Ala Phe Ser Pro Asn Arg Phe Trp Met Cys Val Ala Thr Glu Arg
 245 250 255

Ser Leu Ser Val Tyr Asp Leu Glu Ser Lys Ala Val Ile Ala Glu Leu
 260 265 270

Thr Pro Asp Gly Ala Lys Pro Ser Glu Cys Ile Ser Ile Ala Trp Ser
 275 280 285

Ala Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Ser Gly His Lys Asp Asn Leu Ile Arg
 290 295 300

Val Trp Ser Ile Ser Asp Ala Glu
 305 310

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Simian virus 40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Kernlokalisationssequenz

<400> 9

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Langes T-Peptidfragment des HIV-1 Genprodukts TAT

<400> 10

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 1. PCR-Primer links; synthetisches Oligo

<400> 11
ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct 33

<210> 12
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 1. PCR-Primer rechts; synthetisches Oligo

<400> 12
ttatatgagc tcagaagaca cggacaggga cctcttccgt cg 42

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 2. PCR-Primer links; synthetisches Oligo

<400> 13
ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct 33

<210> 14
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 2. PCR-Primer rechts; synthetisches Oligo

<400> 14
ttatatgagc tcttactcgg ccgtcggaga tgg 33

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Kmp-11 PCR-Primer links; synthetisches Oligo

<400> 15
attataggta ccatggccac cacgtacgag 30

<210> 16
<211> 32

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Kmp-11 PCR-Primer rechts; synthetisches Oligo

<400> 16

ttaattctcg agttacttgg atgggtactg cg

32

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TSA PCR-Primer links; synthetisches Oligo

<400> 17

aattatggta ccatgtcctg cggtaacgcc aagatc

36

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TSA PCR-Primer rechts; synthetisches Oligo

<400> 18

aatatactcg agttactgct tgctgaagta tccttcgac

39

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TSA linker Mutationsprimer; synthetisches Oligo

<400> 19

taccgcggtc tcttcatcat cg

22

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TSA rechter Mutationsprimer; synthetisches Oligo

<400> 20

attggggggtc tcgatgaata gaccgcggta gg

32

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<223> gp63 Fragment 1 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 21

attattggta ccatgtctgt ggact

25

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> gp63 Fragment 1 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 22

ttatatgggc tctctcaggg ctccccagtt g

31

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> gp63 Fragment 2 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 23

attataggtc tcctgagaat tgctgtgtcc acagag

36

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> gp63 Fragment 2 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 24

ttatatgggc tcacagaggc cacatacatc acaa

34

<210> 25

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> gp63 Fragment 3 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 25

tattatgggc tcctctgtgc cctctgagga gggagtgtg gcc

43

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> gp63 Fragment 3 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 26

aattatgggc tcctcaatct ccaggtactc cagg

34

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<210> 27
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gp63 Fragment 4 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 27
attataggtc tcattgagga ccagggagga g 31

<210> 28
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gp63 Fragment 4 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 28
taatatgggc tcgtgtctgg tcactccaca cttg 34

<210> 29
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gp63 Fragment 5 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 29
attataggtc tcagacaccc agacctgccc c 31

<210> 30
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gp63 Fragment 5 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 30
ttatatgggc tcggggtgca gttggcatag cc 32

<210> 31
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gp63 Fragment 6 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 31
atatatgggc tccaccccag gcctgagagt gg 32

<210> 32
<211> 34

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gp63 Fragment 6 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 32
taatatgagc tcctacaggg ccacagccag cagg 34

<210> 33
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gp63 Gesamtsequenz linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 33
attattggta ccatgtctgt ggact 25

<210> 34
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gp63 Gesamtsequenz rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 34
taatatgagc tcctacaggg ccacagccag cagg 34

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> ODN1; synthetisches Oligo

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> T = chemisch modifiziertes Thymin

<400> 35
gggagtccag ttttctggac 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> ODN 2; synthetisches Oligo

<400> 36
aggggtccag ttttctggac 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE2004/002383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/008

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/031469 A (MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND VERTRIEBS GMBH; LOPEZ, SONIA, M) 17 April 2003 (2003-04-17) claims; examples	1,6-17, 19,21-26
Y		1-28
X	LOPEZ-FUERTE L ET AL: "DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against Leishmania major infection in mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 21, no. 3-4, 13 December 2002 (2002-12-13), pages 247-257, XP004394510 ISSN: 0264-410X	1,6-10, 12-17, 19, 21-24,26
Y	Zusammenfassung; Ergebnisse; Diskussion; -/-	1-28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 February 2005

Date of mailing of the international search report

09/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sommer, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/002383

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/098359 A (CORIXA CORPORATION; REED, STEVEN, G; CAMPOS-NETO, ANTONIO; WEBB, JOHN,) 12 December 2002 (2002-12-12)	1,3,6,8, 13,14, 17-20,22
Y	claims; examples 19-23	1-28
X	SKEIKY Y A W ET AL: "Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 27-28, 10 September 2002 (2002-09-10), pages 3292-3303, XP004378524 ISSN: 0264-410X	1,3,6,8, 13,14, 17-20,22
Y	Zusammenfassung; Diskussion;	1-28
X	MENDEZ S ET AL: "Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 31-32, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 3702-3708, XP004388612 ISSN: 0264-410X	1,2,6,8, 13,14, 17,19,22
Y	Zusammenfassung; Diskussion;	1-28
X	RAMREZ J R ET AL: "Attenuated Toxoplasma gondii ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 3-4, 12 November 2001 (2001-11-12), pages 455-461, XP004310152 ISSN: 0264-410X	1,8,13, 14,17, 19,22
Y	abstract	1-28
X	COTE-SIERRA JAVIER ET AL: "Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against Leishmania major" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 70, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 240-248, XP002317814 ISSN: 0019-9567	1,8,13, 14,17, 19,22
Y	abstract	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/002383

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03031469	A	17-04-2003	WO 03031469 A2	17-04-2003
			EP 1432439 A2	30-06-2004
			US 2004235771 A1	25-11-2004
WO 02098359	A	12-12-2002	US 2002081320 A1	27-06-2002
			US 2002169285 A1	14-11-2002
			WO 02098359 A2	12-12-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/002383

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/008

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/031469 A (MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND VERTRIEBS GMBH; LOPEZ, SONIA, M) 17. April 2003 (2003-04-17)	1,6-17, 19,21-26
Y	Ansprüche; Beispiele	1-28
X	LOPEZ-FUERTE L ET AL: "DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against Leishmania major infection in mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 21, Nr. 3-4, 13. Dezember 2002 (2002-12-13), Seiten 247-257, XP004394510 ISSN: 0264-410X	1,6-10, 12-17, 19, 21-24,26
Y	Zusammenfassung; Ergebnisse; Diskussion; ----- -/-	1-28

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. Februar 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/03/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sommer, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/002383

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/098359 A (CORIXA CORPORATION; REED, STEVEN, G; CAMPOS-NETO, ANTONIO; WEBB, JOHN,) 12. Dezember 2002 (2002-12-12)	1,3,6,8, 13,14, 17-20,22
Y	Ansprüche; Beispiele 19-23	1-28
X	SKEIKY Y A W ET AL: "Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 20, Nr. 27-28, 10. September 2002 (2002-09-10), Seiten 3292-3303, XP004378524 ISSN: 0264-410X	1,3,6,8, 13,14, 17-20,22
Y	Zusammenfassung; Diskussion;	1-28
X	MENDEZ S ET AL: "Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 20, Nr. 31-32, 1. November 2002 (2002-11-01), Seiten 3702-3708, XP004388612 ISSN: 0264-410X	1,2,6,8, 13,14, 17,19,22
Y	Zusammenfassung; Diskussion;	1-28
X	RAMREZ J R ET AL: "Attenuated Toxoplasma gondii ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 20, Nr. 3-4, 12. November 2001 (2001-11-12), Seiten 455-461, XP004310152 ISSN: 0264-410X	1,8,13, 14,17, 19,22
Y	Zusammenfassung	1-28
X	COTE-SIERRA JAVIER ET AL: "Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against Leishmania major" INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 70, Nr. 1, Januar 2002 (2002-01), Seiten 240-248, XP002317814 ISSN: 0019-9567	1,8,13, 14,17, 19,22
Y	Zusammenfassung	1-28

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/002383

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO 03031469	A	17-04-2003	WO	03031469	A2		17-04-2003	
			EP	1432439	A2		30-06-2004	
			US	2004235771	A1		25-11-2004	
WO 02098359	A	12-12-2002	US	2002081320	A1		27-06-2002	
			US	2002169285	A1		14-11-2002	
			WO	02098359	A2		12-12-2002	

THIS PAGE BLANK (USPTO)